

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**RESTRICCIÓN ALIMENTICIA EN OVINOS: RESPUESTA ENDOCRINO-
METABÓLICA DEPENDIENTE DE LAS RESERVAS CORPORALES**

por

Andrea FERNÁNDEZ FOREN

TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias
Orientación: Tecnología de los Alimentos

MODALIDAD Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2015**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:

Segundo miembro (Tutor):

Dra. Ana Meikle

Tercer miembro:

Cuarto miembro (co-Tutor):

Dra. Cecilia Sosa

Fecha:

Autora:

Andrea Fernández Foren

AGRADECIMIENTOS

Luego de una gran etapa, de un gran camino recorrido, tengo muchas personas a las que agradecer por formar parte de esta etapa y de mi vida.

Agradezco a mi papá por siempre estar a mi lado impulsándome para seguir y por siempre creer en mí, te quiero con todo mi corazón.

A mi mamá que de alguna forma me acompaña siempre, compañera inseparable, el mejor refugio, las palabras más dulces y tiernas que me hacían sentir en paz. Gracias mamá, gracias por ser la mejor, te extraño y te quiero siempre y con todo mi corazón.

A mis hermanos Martín y Lucía, siempre apoyándonos los tres, siempre juntos, un amor inexplicable. Agradezco a la vida tenerlos. Los quiero.

A Ale, mi amor, mi compañero, que siempre está a mi lado dando lo mejor. Mi gran apoyo en todo, mi gran amor.

A lo más hermoso que la vida me dio, mis hijos, Juan y Lola, que formaron parte de esta carrera y que todos los días me demuestran que vale la pena seguir. Los amo.

A mis amigas Pica, Anita, Marisus, Clau, Manu, Marilin. Hermosas personas que me encontré en los primeros tiempos de mi carrera y que fueron formando parte de mi vida. Hoy seguimos juntas como el primer día. Ustedes saben, "amigas de toda la vida".

A Natalie y Magali, juntas hace ya casi 25 años, hermanas que la vida me dio. Las quiero.

A Lu y Euge Carrion, una amistad increíble, hermosas personas. Gracias por tanto.

A Santiago y Alejandra, gracias por siempre una palabra de aliento, gracias por el aguante, gracias por siempre estar. Gracias amigos.

A todas mis compañeros del laboratorio que siempre tienen una mano tendida y una oreja para escuchar. Paula P, Gretel, Isa, Clau, Paula N, Mile, Vicky

A Cecilia Sosa que junto a ella di mis primeros pasos en la ciencia y por su gran generosidad.

A Ana Meikle, gracias por estar siempre, en cada decisión, en cada caída y en cada triunfo. Gracias por estar a mi lado en mis peores y mejores momentos. Gracias de todo corazón.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	6
RESUMEN	7
SUMMARY	8
INTRODUCCION	9
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	11
Homeostasis y Balances energéticos	11
Regulación hormonal del metabolismo	11
Subnutrición en ovinos	12
Respuestas a la subnutrición acorde al grado de reserva corporal	14
HIPÓTESIS	16
OBJETIVOS	16
Objetivos Generales	16
Objetivos Específicos	16
MATERIALES Y MÉTODOS	16
Animales y tratamientos	16
Muestras sanguíneas	17
Determinaciones analíticas	17
Análisis estadísticos	18
RESULTADOS	19
Peso Vivo	19
Metabolitos	19
	4

Hormonas	21
DISCUSIÓN	23
CONCLUSIONES	26
ANEXO 1	27
BIBLIOGRAFÍA	28

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Página

Figura 1. Representación esquemática de memoria metabólica: historia metabólica reciente (nivel de alimentación, efecto dinámico) o más antigua (reservas corporales, efecto estático)..... 14

Figura 2. Representación esquemática del diseño experimental. Ovejas con una condición corporal inicial moderadamente alta (A) y moderadamente baja (B) alimentadas a 0,5 (subnutridas, S) o 1,5 (control, C) veces sus requerimientos de mantenimiento. Los 4 grupos experimentales fueron: ovejas altas control (AC, barra roja), ovejas altas subnutridas (AS, barra roja y amarilla), ovejas bajas control (BC, barra verde) y ovejas bajas subnutridas (BS, barra verde y amarilla). El área sombreada de gris indica el período del tratamiento con progestágenos para la sincronización de celos. La línea punteada indica el día del celo (día 0) previo al sacrificio el día 5.....17

Figura 3. Peso vivo a lo largo del experimento en ovejas con una condición corporal inicial moderadamente alta (A) y moderadamente baja (B) alimentadas a 0,5 (subnutridas, S) o 1,5 (control, C) veces sus requerimientos de mantenimiento. La flecha negra indica el comienzo de la subnutrición.....19

Figura 4. Concentración plasmática de glucosa, ácidos grasos no esterificados y betahidroxibutirato en ovejas con una condición corporal inicial moderadamente alta (A) y moderadamente baja (B) alimentadas a 0,5 (subnutridas, S) o 1,5 (control, C) veces sus requerimiento de mantenimiento. La flecha negra indica el comienzo de la subnutrición. Los asteriscos denotan diferencias entre grupos, $P < 0,05$ 21

Figura 5. Concentración plasmática de insulina, leptina e IGF-I en ovejas con una condición corporal inicial moderadamente alta (A) y moderadamente baja (B) alimentadas a 0,5 (subnutridas, S) o 1,5 (control, C) veces sus requerimiento de mantenimiento. La flecha negra indica el comienzo de la subnutrición. Los asteriscos denotan diferencias entre grupos, $P < 0,05$22

Tabla 1. Concentraciones de metabolitos y hormonas en ovejas con alta (A) y baja (B) condición corporal inicial alimentadas a 0,5 (subnutridas, S) o 1,5 (control, C) veces sus requerimientos de mantenimiento.....20

RESUMEN

Las respuestas metabólicas a los cambios en el estado corporal podrían depender de la historia metabólica reciente (nivel de alimentación, efecto dinámico) o más antigua (reservas corporales, efecto estático), concepto denominado “memoria metabólica“. El objetivo de este trabajo fue estudiar la respuesta endocrino-metabólica a una restricción alimenticia en ovejas con diferente condición corporal (CC) al inicio del experimento. Durante la estación reproductiva, 36 ovejas Rasa Aragonesa fueron separadas en 2 grupos con diferente CC: CC > 2,75 (moderadamente alta, A, $2,9 \pm 0,04$) y CC < 2,25 (moderadamente baja, B, $2,1 \pm 0,04$). Durante 20 días, ambos grupos recibieron una dieta para cubrir los requerimientos de mantenimiento de energía y proteína, tras lo cual se asignaron al azar a dos tratamientos nutricionales: 1,5 (control, C) o 0,5 (subnutrición, S) veces los requerimientos de mantenimiento diario, estableciéndose cuatro grupos: altas control (AC, n = 9), altas subnutridas (AS, n = 10), bajas control (BC, n = 9) y bajas subnutridas (BS, n = 8). Se determinó el peso vivo (PV) y los niveles plasmáticos de glucosa, ácidos grasos no esterificados (AGNE), β -hidroxibutirato (BHB), insulina, leptina y factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I). Los grupos BS y AS perdieron peso, el grupo BC lo ganó y las ovejas AC lo mantuvieron. En los animales controles, la concentración plasmática de glucosa fue mayor y los AGNE menor en relación a las ovejas subnutridas. Las ovejas de alta CC presentaron mayores concentraciones de insulina y de IGF-I, y la leptina tendió a ser mayor en estos animales. A su vez, la insulina fue mayor en los animales controles, mientras que las otras hormonas no fueron afectadas por la subnutrición. Los perfiles de glucosa, BHB, insulina e IGF-I estuvieron afectados por la CC inicial y el tratamiento nutricional, como así lo demuestra la interacción significativa entre estos factores y días. Se evidenció un aumento en el momento del celo de las concentraciones de los metabolitos (glucosa y BHB) y de las hormonas metabólicas (insulina e IGF-I). En conclusión, en este estudio se encontró que los perfiles de glucosa, BHB, insulina e IGF-I varían de forma diferente frente a una restricción alimenticia en función del grado de reservas corporales de las ovejas en el momento de iniciarse la restricción alimenticia.

SUMMARY

Metabolic responses to changes in metabolic status could depend on recent (feeding level) or more ancient (body reserves) metabolic history, a concept called “metabolic memory”. The aim of this research was to study the metabolic response to food restriction in ewes with different body condition score at the beginning of the experiment (BCS). During the breeding season, 36 Rasa Aragonesa ewes were divided into 2 groups with different BCS: BCS > 2.75 (fat ewes, A, mean \pm standard error: 2.9 ± 0.04) and BCS < 2.25 (lean ewes, B, 2.1 ± 0.04). During 20 days, both groups received a diet to supply energy and protein maintain requirements, each group was divided into 2 groups and were fed to provide either 1.5 or 0.5 times the daily maintenance requirements; therefore, the 4 groups were: fat control (AC, n = 9), fat undernourished (AS, n = 10), lean control (BC, n = 9) and lean undernourished (BS, n = 8) ewes. Body weight (BW), glucose, non-esterified fatty acids (NEFA), β -hydroxybutyrate (BHB), insulin, leptin, and insulin-like growth factor (IGF-I) were determined. BS and AS groups lost weight, BC group gained weight, and AC ewes maintained their BW. Plasma glucose concentration and insulin were higher and NEFA was lower in control ewes. Ewes with high BCS had higher concentrations of insulin and IGF-I, and leptin tended to be higher in these animals. Insulin concentrations were higher in control ewes, while other hormones remained unchanged. Glucose, BHB, insulin and IGF-I profiles were affected by initial BCS and nutritional treatment, as is demonstrated by the significant interaction between these factors and days. Metabolites (glucose and BHB) and metabolic hormones (insulin and IGF-I) concentrations showed a peak at estrus time. In conclusion, it was found that glucose, BHB, insulin and IGF-I profiles respond to undernutrition according to the level of body reserves of the animals at the onset of the nutritional restriction.

INTRODUCCIÓN

La nutrición es uno de los factores más importantes que afectan el ciclo reproductivo de los rumiantes, por lo que es clave cubrir los requerimientos de los animales a los efectos de optimizar su rendimiento productivo (Martin y col., 2004). En ovinos, uno de los aspectos más estudiados quizá sea el efecto de la sobrealimentación o suplementación (flushing), como herramienta para incrementar la tasa de ovulación. Sin embargo, es la subnutrición (la alimentación por debajo de los requerimientos para el mantenimiento del peso vivo) la que se presenta como problema en los rebaños comerciales, principalmente en lugares donde la alimentación está basada en el pastoreo. En países de clima templado, donde los animales pastorean pastos naturales durante todo el año, las variaciones estacionales en la cantidad y calidad de los pastos modifican las ganancias de peso a lo largo del año lo que se ha asociado a la eficiencia reproductiva global (Viñoles y col., 2009).

La subnutrición es una situación a la cual las ovejas en Uruguay se enfrentan año a año, debido a que no tienen un aporte homogéneo de nutrientes durante todo el año por poseer un sistema de cría ovina pastoril extensivo, con altos porcentajes de pasturas naturales (que oscilan entre 93% en basalto superficial, 54% en la región litoral oeste, con un promedio general entre 80-85%) (Carámbula, 2008). En invierno existe una baja disponibilidad de forraje que no permite alcanzar consumos adecuados para suplir los requerimientos de las ovejas de cría en gestación avanzada (Montossi y col., 1998).

El estado metabólico puede definirse como la cantidad de nutrientes y energía que están disponibles para el animal en un determinado momento, y depende de la cantidad de alimento consumido, de la cantidad de reservas corporales y del ritmo de utilización de la energía (Blache y col., 2006). La cantidad de energía disponible incluye la energía derivada de la nutrición y también la energía almacenada en los tejidos corporales, especialmente el tejido adiposo, el cual es un sistema de almacenamiento altamente eficiente (Renaville y col., 2002). La cantidad de energía gastada varía de acuerdo a la edad y el estado fisiológico del animal y comprende la energía utilizada en funciones que son fundamentales para el mantenimiento de la homeostasis y la energía utilizada en necesidades fisiológicas adicionales, tales como el crecimiento y la reproducción (Blache y col., 2006). Clásicamente, las reservas corporales se movilizan en períodos de altas necesidades metabólicas (por ejemplo, al final de la gestación, lactancia) (Chilliard y col., 1998; Friggens y col., 2013) o de muy baja disponibilidad de alimento (por ejemplo, las estaciones secas). Una forma de conocer el estado de las reservas corporales de un animal es a través de la evaluación de su peso vivo (PV) y de su condición corporal (CC). Si bien la composición corporal varía según la raza, la edad y el estado fisiológico, cuando los animales están bajo las mismas condiciones, el uso del PV y la CC para evaluar su estado de reservas corporales es muy conveniente.

A su vez, el sistema endocrino regula el metabolismo a través de señales que regulan finamente los procesos biológicos en diferentes tejidos y órganos que tienen el objetivo final de mantener la homeostasis (Collier y col., 1984). En situaciones de restricción nutricional absoluta o relativa, el equilibrio metabólico es puesto en peligro. La capacidad de los rumiantes para hacer frente a los períodos de restricción nutricional reside en la capacidad de sus mecanismos endocrinos y metabólicos para dirigir el mantenimiento de la homeostasis (Chilliard y col., 1998).

En estudios previos, nuestro grupo (Sosa y col., 2006; 2009) ha encontrado respuestas endocrino-metabólicas diferenciales frente a una misma restricción alimenticia; estos experimentos, se realizaron con animales de la misma raza, pero con una condición corporal

(CC) de partida diferente (0.6 puntos de diferencia en una escala de 0 a 5; Russel y col., 1969). Sin embargo, debido a que estos experimentos no fueron realizados de forma simultánea, no se pudo determinar la relevancia de las reservas corporales sobre la respuesta endocrino-metabólica a la subnutrición. La presente tesis, tiene como hipótesis de trabajo que el estado “estático” de la nutrición (condición corporal) afecta las variaciones hormonales y metabólicas luego de una restricción alimenticia en ovinos.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Homeostasis y Balances energéticos

La homeostasis se define como el conjunto de fenómenos de autorregulación, que conducen al mantenimiento de la constancia en la composición y propiedades del medio interno de un organismo.

A su vez, se puede definir al balance energético como la diferencia que existe entre el ingreso de energía (ingesta de alimento) y el egreso de la misma (gasto), para mantener un nivel constante de energía almacenada, principalmente en forma de adiposidad (Chiquete y Tolosa, 2013). De esta forma, se habla de un balance energético positivo cuando el ingreso de energía supera a su gasto, y de un balance negativo cuando ocurre lo contrario.

En cuanto al metabolismo lo podemos definir como el conjunto de reacciones físicas y químicas que se producen en el organismo y le permiten a los seres vivos realizar sus funciones vitales; de esta forma la transformación de los alimentos en energía y la formación de nuevos componentes, como hormonas y enzimas, son parte de los procesos metabólicos. El concepto de metabolismo incluye dos procesos metabólicos que son el anabolismo y el catabolismo. El anabolismo es el proceso de formación por medio del cual se sintetizan tejidos a partir de los nutrientes básicos, mientras que el catabolismo representa el proceso de destrucción y degradación de los nutrientes generalmente por procesos oxidativos.

En referencia a los conceptos estáticos y dinámicos de la nutrición, se habla de efecto estático cuando se reflejan diferencias mantenidas en el PV o la CC debido a la historia nutricional o fisiológica de las meses previos, mientras que el efecto dinámico lo definimos cuando los efectos obedecen a cambios de PV o CC en períodos más cortos (días/semanas) (Chilliard y col., 1998; Scaramuzzi y col., 2006).

Regulación hormonal del metabolismo

El sistema endócrino, a través de sus hormonas, regula el metabolismo con el fin de mantener la homeostasis. Las vías fisiológicas a través de las cuales el eje somatotropo es informado sobre el estado energético del animal son complejas e involucran a varios metabolitos y hormonas tales como el factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I), insulina y leptina. Una hormona clave en esta regulación es la hormona del crecimiento (GH), esta es un polipéptido de 191 aminoácidos de una sola cadena, sintetizada, almacenada y secretada por las células somatotropas de la adenohipófisis que estimula el crecimiento, metabolismo y reproducción celular. Muchos de los efectos somatogénicos de esta hormona están mediados por (IGF-I) (Breier, 1999; Renaville y col., 2002). El IGF-I es un péptido de 70 aminoácidos, con estructura y función similar a la insulina. El sistema IGF está compuesto por IGF-I, IGF-II, sus receptores y proteínas ligantes. Varios órganos lo sintetizan pero el principal es el hígado, a través de la unión de la GH a receptores, induciendo la síntesis de IGF-I, y ejerce a su vez un control negativo a nivel hipotálamo-hipófisis para la secreción de GH.

Una de las principales hormonas relacionadas con el mantenimiento del equilibrio del medio interno es la insulina. La glicemia es mantenida dentro de un estrecho margen y la insulina está involucrada en la regulación constante de las concentraciones de glucosa (Bassett y col., 1971). En condiciones normales, los tejidos de los rumiantes dependen del transporte de

glucosa promovido por la insulina tanto como en los no rumiantes. La glucosa es un monosacárido, fuente primaria de síntesis de energía de las células mediante su oxidación catabólica, y es el componente principal de polímeros de almacenamiento energético como el almidón y el glucógeno. Por otro lado, la insulina es una proteína que consta de dos cadenas (cadena A: 21 aminoácidos y cadena B: 30 aminoácidos) unidas por dos enlaces disulfuro. Es una hormona anabólica, la cual promueve la glucogenogénesis e inhibe la glucogenólisis, estimula la glucólisis, favorece la síntesis de triglicéridos y proteínas. Juega un papel central en el control homeostático del metabolismo energético (Chilliard y col., 1998) facilitando la entrada de glucosa a las células. Es sintetizada en las células β de los islotes de Langerhans del páncreas, bajo la influencia del estímulo en la ingesta de proteínas y glucosa. El sitio de acción principal es en el hígado, músculo y tejido adiposo, promoviendo así la conversión intracelular de glucosa, carbohidratos, aminoácidos a sus formas de almacenamiento (es decir glucógeno, triglicéridos y proteínas).

Hace ya más de una década, se modificó el concepto de que el tejido adiposo es meramente un depósito de reservas y un receptor de señales hormonales que regulan su función. La detección por primera vez en rumiantes de la leptina, hormona proteica secretada principalmente por el tejido adiposo (Delavaud y col., 2000), puso de manifiesto el importante papel endocrino de este tejido. La leptina es uno de los principales agentes que informan sobre el nivel de almacenamiento de energía periférica a regiones cerebrales que controlan el apetito, el metabolismo y la función endocrina para mantener la homeostasis (Chilliard y col., 1998), teniendo también efectos sobre la fertilidad y sistema inmune (Chilliard y col., 2005). Una vez en el torrente circulatorio actuaría a nivel del sistema nervioso central inhibiendo la producción de neuropéptidos hipotalámicos, que incluyen el neuropéptido Y (NPY), factor estimulante del apetito, dando como resultado la disminución de la ingesta y el aumento del metabolismo basal y el gasto energético (Pisabarro y col., 1999). La síntesis de leptina es muy sensible a cambios en el estado metabólico, aumenta frente a la sobrealimentación o suplementación y disminuye frente a la subnutrición o ayuno, asociándose su reducción con un aumento del apetito y una disminución de la tasa metabólica (Chilliard y col., 2005; Sosa y col., 2009). También se ha sugerido que la leptina regula directamente la función hepática (Yasari y col., 2009), pudiéndose proponer un mecanismo de comunicación entre estos dos principales tejidos metabólicos (hígado y tejido adiposo).

El páncreas, el hígado y el tejido adiposo controlan armónicamente el flujo metabólico al igual que la regulación de la actividad endocrina de cada uno de ellos. Se puede sugerir que la insulina, leptina e IGF-I, no solo regulan el flujo metabólico, sino que su regulación es interdependiente facilitando así la comunicación entre estos tres tejidos (Seufert y col., 1999; Butler y col., 2003; Rhoads y col., 2004; Morioka y col., 2007; Yoshida y col., 2007).

Subnutrición en ovinos

Los períodos de balance energético negativo (BEN) están caracterizados por la movilización grasa que se refleja en un aumento de la concentración circulante de ácidos grasos no esterificados (AGNE) (Pedron y col., 1993; Ingvarlsen y Andersen, 2000; Burke y Roche, 2007), que a menudo se acompaña con el incremento en la producción de cuerpos cetónicos, como el β -hidroxibutirato (BHB) (Whitaker y col., 1999). También, durante el BEN, ocurre una redistribución y utilización diferencial de nutrientes, por lo que los tejidos periféricos pueden utilizar otros nutrientes en lugar de la glucosa, permitiendo así una mayor disponibilidad de glucosa en los tejidos periféricos para otras funciones vitales (Bell y

Bauman, 1997). Los AGNE son utilizados por el hígado como fuente de energía (Drackley y col., 2006), reesterificados a triglicéridos hepáticos y exportados nuevamente a circulación en la forma de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). No obstante, en determinadas situaciones (por ejemplo, en períodos de balance energético negativo), los AGNE pueden ser convertidos a cuerpos cetónicos, los que al incrementarse sobre los niveles normales, causan el cuadro conocido como cetosis (Grummer, 1993). El BHB es un derivado hidrosoluble de los ácidos grasos, principal cuerpo cetónico circulante. Se produce en el hígado y en la pared del rumen (a partir del ácido butírico durante su absorción). Cumple función como sustrato energético para los tejidos (cerebro, corazón y músculos).

Para lograr mantener el equilibrio del medio interno y las funciones vitales durante una subnutrición, se dan numerosos cambios en las concentraciones hormonales y en su sensibilidad tisular (Chilliard y col., 1998). La GH juega un papel clave en la subnutrición regulando la utilización de glucosa (Renaville y col., 2002; Flint y col., 2003). En períodos de subnutrición, existe un desacoplamiento hepático en el eje GH-IGF-I, es decir, el hígado es menos sensible a la GH (menor contenido del receptor de GH, especialmente el subtipo 1A), resultando en una reducción de la concentración circulante de IGF-I (Thissen y col., 1994; Chilliard y col., 1998; Kobayashi y col., 1999). Esto repercute en varios órganos y tejidos, ya que el IGF-I es anabólico y estimula el crecimiento, pero se destaca además que la falta de retroalimentación negativa sobre la GH, promueve una mayor concentración circulante de esta hormona y por lo tanto, una mayor acción teleofóretica (Meikle y col., 2010).

Si bien se considera que el desacoplamiento del eje somatotropo en períodos de subnutrición es una estrategia del rumiante para enfrentar la crisis energética, existen otras señales hormonales que tienen un papel clave. La insulina, como ya fue mencionado, tiene múltiples efectos en el metabolismo; entre los más importantes está el facilitar la entrada de glucosa a las células desde la circulación general y estimular el almacenamiento de lípidos (Bell, 1995; Etherton, 2004). En períodos de subnutrición la concentración de insulina disminuye, y por lo tanto, la estimulación del anabolismo está disminuida. Simultáneamente, la GH aumenta la lipólisis y disminuye los eventos regulados por la insulina, como son el transporte de la glucosa y la lipogénesis (Flint y col., 2003). Así, el anabolismo es inhibido directamente por la disminución en las concentraciones de insulina, e indirectamente por la falta de efecto estimulador de la insulina sobre la sensibilidad de GH (GHR) que limita la síntesis hepática de IGF1 (de Brun, 2014). La insulina es uno de los indicadores metabólicos más eficientes en reflejar el estado nutricional de las ovejas, obteniendo variaciones significativas según el grado de alimentación y la condición corporal. (Caldeira y col., 2007).

La subnutrición provoca una movilización de las reservas grasas, como lo demuestra las concentraciones disminuidas de leptina (Sosa y col., 2006; 2009), ya que cuando los aportes no satisfacen los requerimientos energéticos, el animal dispone de sus reservas de triacilglicéridos para su utilización por los diferentes tejidos (Chilliard y col., 1998). La menor concentración de leptina en los animales subnutridos podría actuar como una señal para aumentar el apetito y disminuir el gasto de energía; lo que sugiere que es una señal para las adaptaciones endocrinas, metabólicas y de comportamiento dirigidas a restaurar la homeostasis (Chilliard y col., 2000; 2001).

Respuestas a la subnutrición acorde al grado de reserva corporal

Las respuestas metabólicas a los cambios en el estado metabólico podrían depender de la historia metabólica reciente (nivel de alimentación, efecto dinámico) o más antigua (reservas corporales, efecto estático), concepto denominado “memoria metabólica” (Chilliard y col., 2005; Blache y col., 2006). Se ha sugerido que el impacto de la subnutrición varía de acuerdo con el estado fisiológico del animal y de acuerdo con su condición corporal (Blanc y col., 2006). En los trabajos previos de Sosa y col., (2006, 2009), ovejas adultas fueron sometidas a períodos de subnutrición (mitad de mantenimiento) de entre 18 y 27 días. El tratamiento nutricional fue eficaz produciendo los cambios deseados: disminución del PV y de la CC desde el comienzo de la nutrición diferencial, con la alteración de perfiles metabólicos como consecuencia del estado de déficit energético. Sin embargo, las respuestas endocrino-metabólicas a la restricción no fueron similares entre los experimentos, y se observaron principalmente en las concentraciones de glucosa, insulina e IGF-I. Mientras que en el experimento de Sosa y col., (2006) las ovejas subnutridas presentaron una mayor concentración de glucosa junto con menores concentraciones de insulina e IGF-I; en el experimento de Sosa y col., (2009) no se observaron diferencias en la concentración de glucosa, y solo en días específicos las ovejas subnutridas presentaron menores niveles de insulina. Los experimentos realizados fueron diferentes en cuanto a los rangos en los que fluctuaron el PV y la CC. Como el PV y la CC iniciales de los animales del experimento de Sosa y col., (2009) fueron mayores (alrededor de un 10%) que los del experimentos de Sosa y col., (2006), y el porcentaje de pérdida de PV y CC de las ovejas subnutridas fue similar, los valores finales de las ovejas subnutridas del experimento de Sosa y col., (2009) fue mayor que los del experimento de Sosa y col., (2006). De esta forma, las ovejas subnutridas del experimento de Sosa y col., (2009) tenían, al momento del sacrificio, un PV y una CC equivalentes al de las ovejas controles del experimento Sosa y col., (2006).

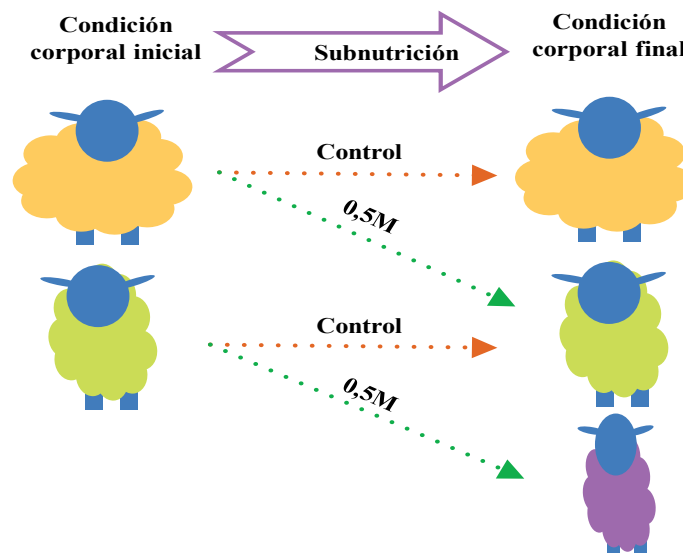


Figura 1. Representación esquemática de memoria metabólica: historia metabólica reciente (nivel de alimentación, efecto dinámico) o más antigua (reservas corporales, efecto estático). Tomado de Cecilia Sosa 2007.

Experimentos conceptualmente similares fueron realizados por Soca y col., (2013), en los cuales clasificaron vacas acorde a la CC al parto en dos grupos: CC moderada (≥ 4) y CC baja (≤ 3.5), de acuerdo a su CC al parto. A los 67 días posparto, se realizaron los tratamientos nutricionales que consistieron en un grupo con flushing durante 22 días y un grupo control que no recibió suplementación (los tratamientos nutricionales fueron aplicados en los grupos de CC moderada y CC baja). Estos autores reportan que la mayor CC en el grupo de CC moderada es consistente con las mayores concentraciones de insulina e IGF-I a lo largo de todo el experimento, lo que refleja su mejor estado metabólico. A su vez, encontraron que el efecto del flushing sobre los perfiles de insulina e IGF-I era dependiente de la CC al parto dado que no se observaron aumentos de estas hormonas en las vacas de baja CC. Los autores sugieren que las diferencias en los patrones de respuesta endócrina al flushing en vacas de cría con CC moderada vs CC baja al parto reflejarían la influencia de la memoria metabólica. A su vez, proponen que las concentraciones de IGF-I integrarían la memoria metabólica (reserva de energía) y la energía disponible, mientras que las concentraciones de insulina y AGNE pueden ser un reflejo del equilibrio entre la ingesta diaria y los requerimientos de energía. Similares resultados fueron reportados en vaca lechera por Meikle y col., (2004) y Adrien y col., (2012).

HIPÓTESIS

Las respuestas metabólicas y endocrinas frente a un tratamiento de subnutrición agudo (efecto dinámico) podrían depender de las reservas energéticas corporales iniciales (CCi, efecto estático).

OBJETIVOS

Objetivos Generales

Estudiar la respuesta metabólica –en términos de metabolitos y hormonas– a una restricción alimenticia en ovejas con diferente grado de reservas (en términos de condición corporal) al inicio del experimento.

Objetivos Específicos

Determinar peso vivo de los animales y la concentración de glucosa, ácidos grasos no esterificados, betahidroxibutirato, insulina, IGF-I y leptina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y tratamientos

Este experimento se llevó a cabo en la granja experimental de la Universidad de Zaragoza, España (latitud 41°41' N), bajo la supervisión del Comité de Ética de la Universidad de Zaragoza y de acuerdo a las exigencias de la Unión Europea para la experimentación animal. Durante la estación reproductiva (Diciembre-Marzo), 36 ovejas Rasa Aragonesa fueron separadas en 2 grupos con diferente CC (CC inicial, CCi) (CC, escala de 0 a 5; Russel y col., 1969): CCi > 2,75 (n=19, moderadamente alta, A) y CCi < 2,25 (n=17, moderadamente baja, B). El peso vivo (PV) al inicio del experimento fue de 61,9 ± 1,6 kg y 50,9 ± 1,7 kg para el grupo A y B, respectivamente; y la CCi fue de 2,9 ± 0,04 para el grupo A y 2,1 ± 0,04 para el B. Durante 20 días, ambos grupos recibieron una dieta para cubrir los requerimientos de mantenimiento en energía y proteína (AFRC, 1993). Las dietas consistieron en: 0,45 kg de materia fresca (MF) de concentrado (pienso) y 0,55 kg MF de paja/oveja/día para el Grupo A, y en 0,40 kg MF de concentrado y 0,50 kg MF de paja/oveja/día para el Grupo B. Ambas dietas proporcionaron 2 Mcal EM/kg MF y 9% de PB. El concentrado estaba compuesto por cebada y soja, en una relación porcentual de 85:15. Tras este período, cada grupo fue dividido en 2 grupos que fueron alimentados para proporcionar 1,5 (control, C) o 0,5 (subnutrición, S) veces los requerimientos diarios de mantenimiento de acuerdo a nuestros trabajos previos (Abecia y col., 1993; 1995; Lozano y col., 1998; Sosa y col., 2006). Las dietas consistieron en 0,60 kg (MF) de pienso y 0,9 kg MF de paja/oveja/día para la dieta 1,5M (grupo C) y 0,20 kg MF de pienso y 0,30 kg MF de paja/oveja/día para la dieta 0,5 M (grupo S). Ambas dietas proporcionaron 2,1 Mcal EM/kg MF y 11% de PB. El concentrado estaba compuesto por cebada y soja en una relación de 66:34. Por lo tanto, los 4 grupos experimentales fueron: ovejas altas control (AC, n = 9), ovejas altas subnutridas (AS, n = 10), ovejas bajas control (BC, n = 9) y ovejas bajas subnutridas (BS, n = 8). Al comienzo del tratamiento con las diferentes dietas, todas las ovejas fueron sincronizadas con esponjas intravaginales

impregnadas de progestágeno (acetato de fluorogestona, 40 mg; ISPAH, Salamanca, España) durante 14 días. Al momento de la retirada de las esponjas, las ovejas fueron inyectadas i.m. con 300 UI de gonadotropina coriónica equina (Sincropart® PMSG, Ceva Salud Animal, Barcelona, España) y el estro (Día 0) se detectó cada 8 horas a partir de las 24 horas de retiradas las esponjas, usando moruecos vasectomizados. El día 5 después del celo, los animales de cada grupo fueron sacrificados para realizar otros estudios. El PV fue determinado los días -35, -21, -15 (inserción de esponjas e inicio de dietas diferenciales), -1 (retiro de esponjas) y 5 (sacrificio), con respecto al estro.

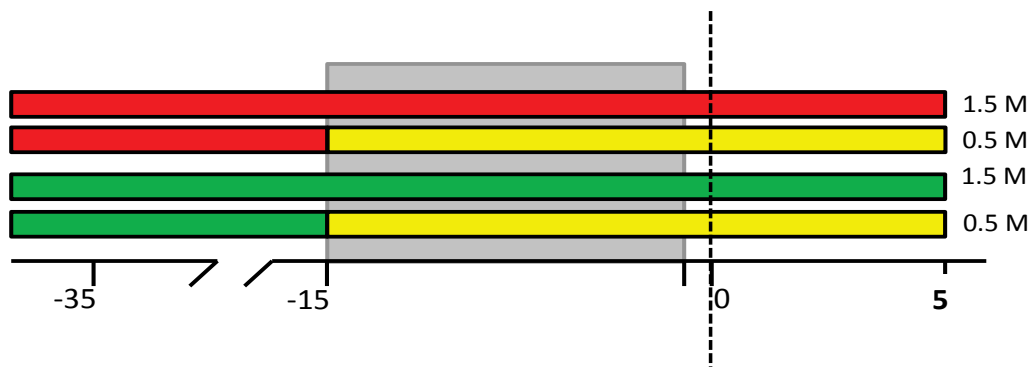


Figura 2. Representación esquemática del diseño experimental. Ovejas con una condición corporal inicial moderadamente alta (A) y moderadamente baja (B) alimentadas a 0,5 (subnutridas, S) o 1,5 (control, C) veces sus requerimientos de mantenimiento. Los 4 grupos experimentales fueron: ovejas altas control (AC, barra roja), ovejas altas subnutridas (AS, barra roja y amarilla), ovejas bajas control (BC, barra verde) y ovejas bajas subnutridas (BS, barra verde y amarilla). El área sombreada de gris indica el período del tratamiento con progestágenos para la sincronización de celos. La línea punteada indica el día del celo (día 0) previo al sacrificio el día 5.

Muestras sanguíneas

Las muestras de sangre se extrajeron cada 3 días en tubos de vacío con heparina de la vena yugular de animales en ayuno, desde el día anterior del comienzo de las dietas diferenciales (día -16) hasta el final del experimento. El plasma fue separado por centrifugación a 1000g por 10 minutos y almacenado a -20°C hasta la posterior determinación de hormonas y metabolitos.

Determinaciones analíticas

Las concentraciones de glucosa y BHB se determinaron usando un analizador automático (Gernonstar®, Transasia, Bombay, India). Para la determinación de glucosa se utilizó un kit

enzimático (Gernon®, RAL for Laboratorios Techniques, Barcelona, España) y los coeficientes de variación (CV) intra- e inter-ensayo fueron 2,2% y 3,1%, respectivamente. La sensibilidad del ensayo fue de 1 mg/dL. La concentración de BHB también se determinó utilizando kits comerciales (RANBUT®, Randox Laboratories Ltd., Crumlin, Reino Unido) y su sensibilidad fue de 0,1 mmol/L. Los coeficientes de variación (CV) intra- e inter-ensayo fueron menores del 6%. Los AGNE fueron cuantificados utilizando el kit NEFA-HR (2) (Wako Chemicals, Richmond, Estados Unidos) con el volumen de muestra y reactivos ajustados para una placa de 96 pocillos (Multiskan EX; Thermo Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos). La sensibilidad del ensayo fue de 0,01 mmol/L y el CV intra-ensayo fue 12,5%.

Las determinaciones hormonales se realizaron en el Laboratorio de Técnicas Nucleares, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay. Las concentraciones de insulina fueron determinadas por un radioinmunoensayo (RIA) en fase sólida utilizando kits de DPC (Diagnostic Product Co., Los Angeles, CA, Estados Unidos). La concentración mínima detectable del ensayo fue de 2,2 mUI/mL. Los CV intraensayo para controles bajos (3,2 mUI/mL) y medios (12,6 mUI/mL) fueron 8,2 y 9,4%, respectivamente. El IGF-I fue determinado usando un ensayo inmuno-radiométrico de un kit comercial (IGF1-RIACT CisBio International, GIFSR-YVETTE CEDEX, Francia), previamente comunicado por (Adrien y col., 2011). La sensibilidad del ensayo fue de 0,7 ng/mL. Los CV intra-ensayo para el control 1 (44 ng/mL) y el control 2 (521 ng/mL) fueron de 8,2 y 7,9%. La concentración de leptina se determinó por un RIA en fase líquida usando un kit comercial Multi-Species Leptin (Millipore, Cat XL-85K) previamente comunicado en bovinos (Pinotti y Rosi, 2006). La sensibilidad fue de 1,8 ng/mL. Los CV intra-ensayo para el control 1 (5,3 ng/mL) y el control 2 (18,3 ng/mL) fueron 5,6 y 5,1%, respectivamente.

Análisis estadísticos

Todas las variables fueron analizadas por un ANOVA utilizando un procedimiento mixto de medidas repetidas. El modelo incluyó los efectos fijos de CC inicial (moderadamente alta o moderadamente baja), tratamiento nutricional (control o subnutrición), días y sus interacciones y la estructura de covarianza autorregresiva de primer orden. Se utilizó el procedimiento Kenward-Rogers para ajustar los grados de libertad del denominador. La separación de medias se realizó por el test de Tukey. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., Cary, NC, Estados Unidos). Los datos se presentan como medias de mínimos cuadrados \pm errores estándares combinados. Las diferencias entre medias se consideraron significativas cuando $P < 0,05$, y tendencia cuando $0,05 < P < 0,10$.

RESULTADOS

Peso Vivo

Desde el comienzo del experimento hasta el día -15 (comienzo del tratamiento nutricional), el PV fue menor en las ovejas de baja CC en comparación con las de alta CC (Figura 3). Desde el día -15 hasta el día 5, las ovejas BS y AS perdieron peso vivo (6 y 7,3 kg, respectivamente; $P < 0,05$), mientras que el grupo BC ganó 5,8 kg ($P < 0,05$) y las ovejas AC mantuvieron su PV (Figura 3).

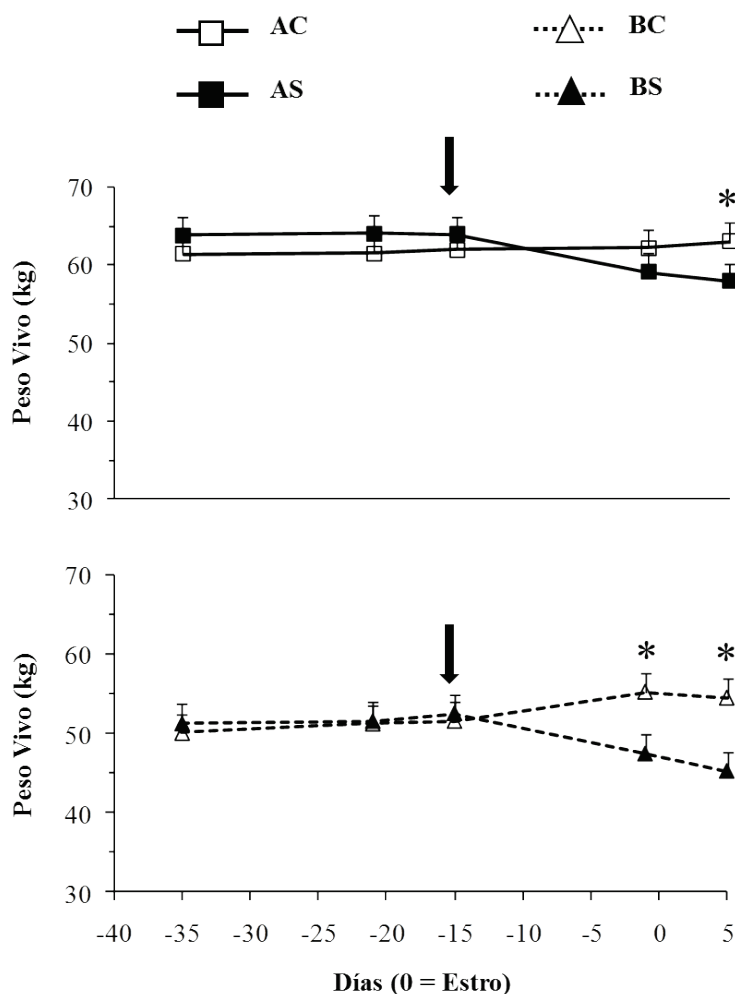


Figura 3. Peso vivo a lo largo del experimento en ovejas con una CCi moderadamente alta (A) y moderadamente baja (B) alimentadas a 0,5 (subnutridas, S) o 1,5 (control, C) veces sus requerimientos de mantenimiento. La flecha negra indica el comienzo de la subnutrición. Los asteriscos indican diferencias entre grupos.

Metabolitos

Las concentraciones de glucosa fueron mayores en los grupos control respecto de los subnutridos (Tabla 1); evidenciándose este efecto en determinados días durante el experimento (Figura 4). La triple interacción entre CCi, tratamiento nutricional y día tendió a

afectar las concentraciones de glucosa ($P = 0,08$). Los grupos subnutridos disminuyeron en un 10% la concentración de glucosa en el primer muestreo después de iniciada la subnutrición (66 vs 58,7 mg/dL; $P < 0,05$). Los niveles se mantuvieron bajos excepto por el aumento pronunciado de glucosa observado un día antes del estro (día-1) en todos los grupos exceptuando las BS, seguido por una disminución hasta el día 2 para todos los grupos (Figura 4). No hubo efecto de la CCi ni de su interacción con el tratamiento nutricional.

Las ovejas subnutridas presentaron concentraciones de AGNE superiores a las ovejas controles ($P < 0,05$), independientemente de su CCi (Tabla 1). No hubo efecto de la CCi ni de su interacción con el tratamiento nutricional. Se observó una interacción entre tratamiento nutricional y día de muestreo en las concentraciones de AGNE ($P < 0,01$). Seis días después de iniciada la subnutrición las concentraciones de AGNE aumentaron en las ovejas AS ($P < 0,05$), mientras que las AC se mantuvieron estables. Sin embargo, en el grupo BS el aumento ocurrió en el primer muestreo post tratamiento y en este mismo día, el grupo BC disminuyó la concentración de AGNE. Mientras que las AS mantuvieron concentraciones de AGNE estables, con un aumento el último día de muestreo, las BS presentaron fluctuaciones importantes (Figura 4).

Los perfiles de BHB no se vieron afectados por el tratamiento nutricional, la CCi ni la interacción entre ambas variables. Sí se observó una tendencia a ser afectados por la triple interacción entre CCi, el tratamiento nutricional y el día de muestreo ($P = 0,06$) dada fundamentalmente por diferencias en días puntuales. Las ovejas AS presentaron mayor concentración de BHB que el grupo AC ocho días después de iniciado el tratamiento nutricional ($P < 0,05$; Figura 4), mientras que esta diferencia no se observó en las ovejas de baja CCi. Por otro lado, en las BS se observó mayor concentración de BHB un día antes del estro que en las BC ($P < 0,05$). Se observó un aumento en las concentraciones de BHB un día antes del estro (día-1) en todos los grupos ($P < 0,05$), excepto el BC (Figura 4).

Tabla 1. Concentraciones de metabolitos y hormonas en ovejas con alta (A) y baja (B) CCi alimentadas a 0,5 (subnutridas, S) o 1,5 (control, C) veces sus requerimientos de mantenimiento.

	CCi		Tratamiento nutricional	
	A	B	C	S
Glucosa (mg/dL)	61,4 ± 1,0	62,7 ± 1,1	63,8 ± 1,0 ^a	60,3 ± 1,0 ^b
AGNE (mmol/L)	0,54 ± 0,05	0,58 ± 0,06	0,36 ± 0,05 ^a	0,76 ± 0,05 ^b
BHB (mmol/L)	0,24 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,26 ± 0,01
Insulina (μUI/mL)	4,84 ± 0,38 ^a	3,49 ± 0,40 ^b	4,64 ± 0,39 ^x	3,70 ± 0,39 ^y
Leptina (ng/mL)	2,94 ± 0,19 ^x	2,49 ± 0,21 ^y	2,78 ± 0,19	2,65 ± 0,20
IGF-I (ng/mL)	395,2 ± 28,4 ^a	261,6 ± 30,0 ^b	333,6 ± 29,2	323,3 ± 29,3

Superíndices diferentes en la misma fila indican diferencias estadísticas: ^{a,b} $P < 0,05$; ^{xy} $0,05 < P < 0,10$.

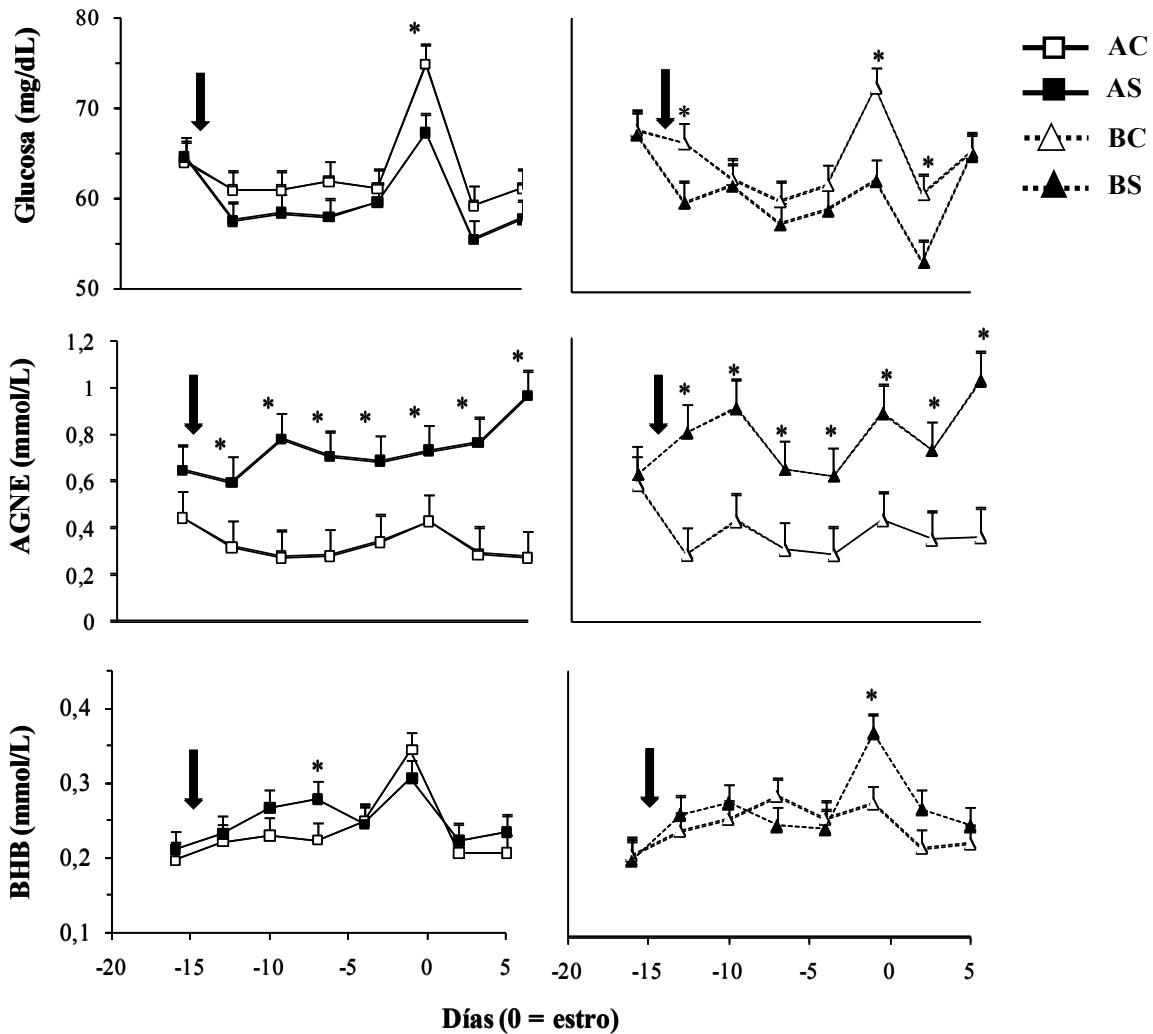


Figura 4. Concentración plasmática de glucosa, AGNE y BHB en ovejas con una CCI moderadamente alta (A) y moderadamente baja (B) alimentadas a 0,5 (subnutridas, S) o 1,5 (control, C) veces sus requerimiento de mantenimiento. La flecha negra indica el comienzo de la subnutrición. Los asteriscos denotan diferencias entre grupos, $P < 0,05$.

Hormonas

Las ovejas de alta CCI presentaron mayor concentración de insulina en comparación con las ovejas de baja CCI ($P < 0,05$), así como las ovejas con una dieta de mantenimiento tendieron a tener mayores concentraciones de insulina que las subnutridas ($P < 0,09$; Tabla 1). Las concentraciones de insulina se vieron afectadas por la triple interacción entre CCI, tratamiento nutricional y día ($P < 0,05$): las ovejas con alta CCI mantuvieron niveles de insulina altos hasta el estro, el grupo AC mostró un aumento marcado al estro, y tras ese día ambos grupos disminuyeron (Figura 5). Por otro lado, en las ovejas con baja CCI se observó un claro efecto de la subnutrición, disminuyendo las concentraciones que se mantuvieron bajas hasta el final del ensayo. En el grupo BC los niveles se mantuvieron estables y no se observaron aumentos alrededor del estro (Figura 5).

Las ovejas con alta CCI tendieron a presentar mayores concentraciones de leptina que las de baja CCI ($P = 0,1$; Tabla 1). No se observó efecto del tratamiento nutricional ni de su

interacción con la CCI. La triple interacción día x tratamiento x CCI no fue significativa, a pesar de que se observaron diferencias puntuales. El grupo AC presentó mayores concentraciones de leptina que el grupo AS entre los días -10 y -7 del ciclo ($P < 0,05$), dado principalmente por una drástica caída de la concentración de leptina a partir del inicio de la subnutrición en este último grupo. Una disminución menos marcada se evidenció en el grupo BS (Figura 5). No se observaron diferencias entre las ovejas con baja CCI.

Las concentraciones de IGF-I fueron mayores en las ovejas con alta CCI que en las de baja CCI ($P < 0,01$; Tabla 1). No se observó efecto del tratamiento nutricional ni de su interacción con la CCI. Las concentraciones de IGF-I tendieron a estar afectadas por la triple interacción entre CCI, tratamiento nutricional y día ($P = 0,07$). Las concentraciones a lo largo del tiempo tendieron a ser diferentes entre los distintos grupos: no se encontraron diferencias entre las ovejas con alta CCI, subnutridas o control, los niveles aumentaron alrededor del estro y disminuyeron posteriormente; mientras que se observó un aumento en las concentraciones de IGF-I en las BC con respecto a las BS en el primer muestreo post-tratamiento y los niveles volvieron aumentar alrededor del estro. De forma similar a la glucosa, se detectó un aumento ($P < 0,05$) de IGF-I alrededor del estro en todos los grupos exceptuando las BS, seguido por una disminución hasta el día 5 (Figura 5).

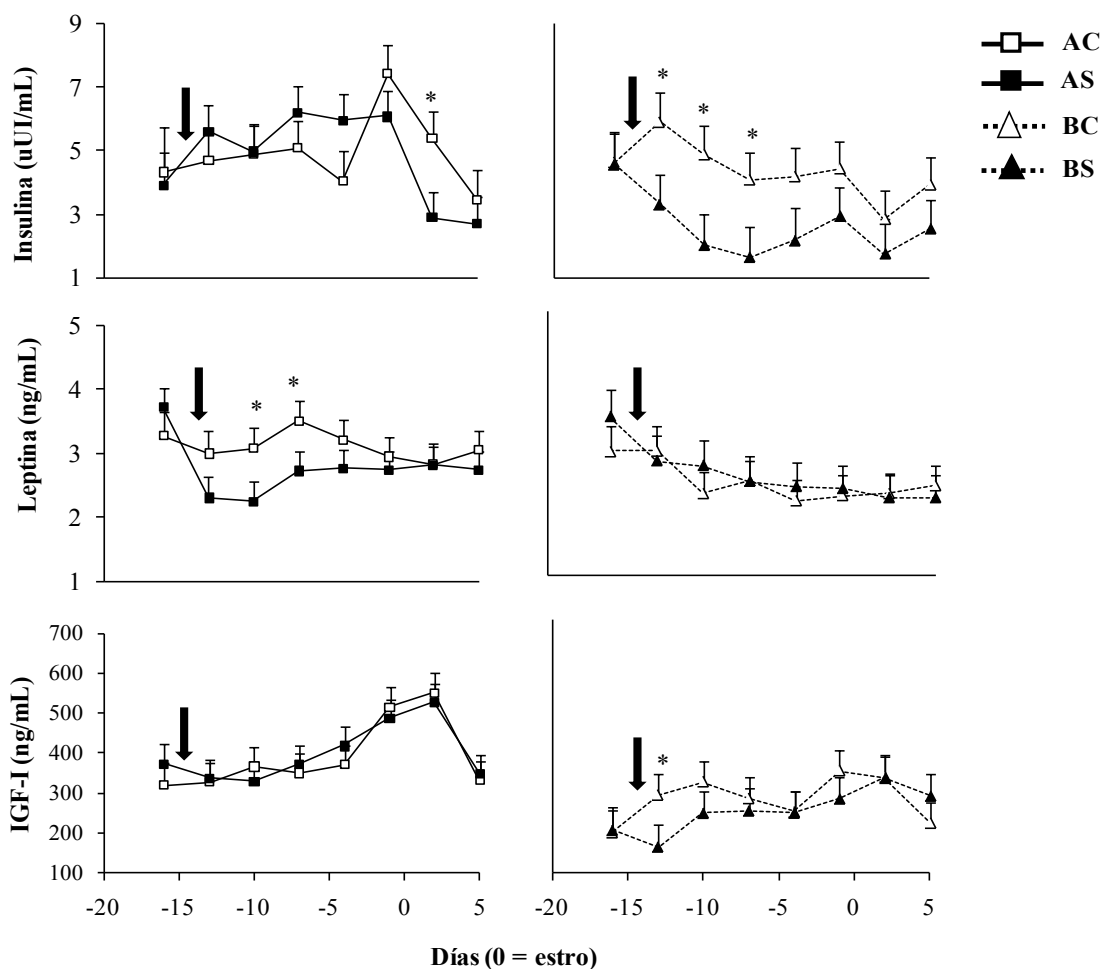


Figura 5. Concentración plasmática de insulina, leptina e IGF-I en ovejas con una CCI moderadamente alta (A) y moderadamente baja (B) alimentadas a 0,5 (subnutridas, S) o 1,5 (control, C) veces sus requerimientos de mantenimiento. La flecha negra indica el comienzo de la subnutrición. Los asteriscos denotan diferencias entre grupos, $P < 0,05$.

DISCUSIÓN

En este trabajo se pone en evidencia que la respuesta endocrino-metabólica a una restricción alimenticia – 0,5 M – en ovejas depende del grado de reservas corporales iniciales (o memoria metabólica), lo cual se evidencia en los diferentes patrones observados a lo largo del experimento en las concentraciones de glucosa, BHB, insulina e IGF-I.

La subnutrición a mitad de los requerimientos para mantenimiento provocó una disminución de 6 kg de PV en las ovejas con alta CCi (CCi: 2,9) y de 7,3 kg en las ovejas con baja CCi (CCi: 2,1). Resultados similares se encontraron cuando se realizaron tratamientos de subnutrición semejantes: ovejas con mejor CC (3,4) perdieron 5 kg de PV (Sosa y col., 2009), mientras que ovejas más delgadas (CC de 2,9 y 2,8) perdieron 6,8 y 7 kg respectivamente (Sosa y col., 2004; 2006). Esto podría deberse a que animales más engrasados (mayor CC y PV) presentan un mayor porcentaje de lípidos corporales (Caldeira y Portugal, 2007) obteniendo más energía por kg de PV movilizado (Williams y col., 1989) debido a la mayor concentración energética de las grasas frente a proteínas o carbohidratos (2 a 2,5 veces mayor). Por otro lado, las ovejas AC mantuvieron su PV coincidiendo con trabajos previos (Sosa y col., 2004; 2006). Sin embargo, el grupo BC aumentó su PV probablemente como una respuesta compensatoria frente a la restricción alimenticia anterior.

Las concentraciones de glucosa fueron mayores en los grupos control respecto de los subnutridos, lo que es consistente con los tratamientos efectuados. Petterson y col., (1993) no encontraron diferencias en concentraciones de glucosa basal entre ovejas con dietas de 1 o 0,5 M, pero en este estudio se tomó una única muestra. Sosa y col., (2009) observaron que la subnutrición no afectó las concentraciones de glucosa, pero la frecuencia de muestreo fue menor a la del presente estudio. Esta señal de energía disponible está finamente regulada aún en el rumiante (Chilliard y col., 1998), y desencadena respuestas endocrinas específicas como las que se analizaron en el presente estudio.

La movilización de reservas provocada por la subnutrición se observó en el aumento de los AGNE tanto en animales con alta como con baja CCi. Este mecanismo de adaptación a la restricción de nutrientes es muy conocido y ha sido descrito en rumiantes y en experimentos similares al presente (Chilliard y col., 1998; Sosa y col., 2006; 2009). No se observaron diferencias en los niveles de AGNE de las ovejas con alta y baja CCi tras la subnutrición, a pesar de que las de alta CCi presentaban PV y CC iniciales mayores que las de baja CCi (11 kg y 0,8 puntos de CC de diferencia, respectivamente) sugiriendo una tasa de lipólisis similar entre estos grupos. Adrien y col. (2012) reportan que las concentraciones de AGNE fueron mayores en el grupo de vacas primíparas de alta CC en comparación con la de baja CC, sugiriendo que la menor concentración de AGNE en el grupo de baja CC se podría deber a la menor cantidad de reservas que pueden ser movilizadas. Por otra parte, no se observaron diferencias importantes en las concentraciones de BHB entre grupos, sino aumentos puntuales de los grupos subnutridos frente a sus respectivos controles. Si bien estos aumentos de BHB concuerdan con aumentos anteriores o simultáneos de AGNE en estos grupos, el BHB no fue un buen indicador de restricción energética. El BHB es un producto de la degradación de los AGNE y se esperaría que el aumento de éstos estuviera acompañado por un aumento concomitante de BHB en sangre (Bouchat y col., 1981; Chilliard y col., 1998).

Las concentraciones de insulina fueron mayores en las ovejas con alta CCi en comparación con las de baja CCi, reflejando un mejor estatus energético. En este sentido, Soca y col.

(2013) también reportan mayores concentraciones de insulina en vacas de cría de mayor CC (CC moderada) en relación a las de menor CC a lo largo de todo el experimento. Un hallazgo interesante de este trabajo fue la respuesta diferencial frente a la restricción alimenticia en esos dos grupos de animales: mientras que en las ovejas AS las concentraciones de insulina disminuyeron 2 semanas después de haberse iniciado el tratamiento, en las ovejas BS se observó una caída importante en el primer muestreo post-subnutrición. Teniendo en cuenta los perfiles de glucosa de estos grupos, se puede sugerir que si bien en las ovejas con baja CCi, la disminución de la glucosa actuó como señal metabólica para la regulación de la secreción de insulina, en las ovejas con alta CCi la secreción de insulina fue –al menos en parte– independiente de la caída plasmática de glucosa. La regulación de la secreción de la insulina es compleja ya que se ha demostrado en roedores que además de la glucosa, intervienen la propia insulina, la leptina y el IGF-I (ver debajo). Este hallazgo podría implicar una adaptación metabólica diferencial en la que las ovejas con niveles críticos de reservas energéticas responden rápidamente a la ingesta diaria, mientras que ovejas en un estado energético superior (reservas) presentan una mayor independencia temporal de la misma. Bouchat y col. (1981) sugirieron que cuando se comparan animales delgados y gordos, hay diferencias importantes en la concentración de metabolitos en sangre en situaciones de ayuno, pero el estudio realizado por estos autores no pudo demostrar esta hipótesis. La disminución de insulina en animales BS es consistente con los bajos niveles de glucosa y los altos de AGNE que en conjunto reflejan un estado catabólico acorde a la ingesta insuficiente de nutrientes. Si bien Petterson y col. (1993) no pudieron demostrar una disminución de insulina frente a una subnutrición similar, el número de muestras consideradas en ese estudio es pobre y las diferencias numéricas presentadas son importantes, lo que respaldaría lo observado en el presente trabajo. Del mismo modo, Soca y col. (2013) reportan una respuesta diferencial frente al tratamiento nutricional (en este caso flushing) dependiente de la CC al parto, evidenciado por el aumento de insulina e IGF-I en animales sometidos al flushing con mejor CC al parto en comparación al grupo que tuvo el mismo tratamiento nutricional pero con una peor CC al parto en los cuales no se evidenció aumento de estas hormonas.

Se ha demostrado que una estrategia desarrollada en el rumiante frente a la restricción alimenticia, es el desacoplamiento en el eje GH-IGF-I, resultando en aumento de las concentraciones de GH y una disminución en la concentración circulante de IGF-I (Thissen y col., 1994; Chilliard y col., 1998; Kobayashi y col., 1999). Sin embargo, en nuestro estudio no se observó disminución de esta última hormona en ninguno de los grupos subnutridos. De forma similar, no se observaron disminuciones importantes de IGF-I tras la subnutrición en trabajos previos (Sosa y col., 2006; 2009), observándose diferencias sólo alrededor del estro (Sosa y col., 2006). En el presente estudio, las concentraciones de IGF-I presentan un claro efecto de la CCi de los animales siendo superiores las concentraciones en las ovejas gordas, siendo el indicador que mejor reflejó el efecto estático de la nutrición. En este sentido, Soca y col. (2013) también reportan mayores concentraciones de IGF-I en vacas con mayor CC al parto. A su vez, Adrien y col. (2012) reportan que los perfiles de IGF-I reflejan mejor los cambios en la CC en contraste con los perfiles de insulina que fueron asociados más con los efectos dinámicos de la nutrición. Los niveles de IGF-I más altos en ovejas gordas son consistentes con los niveles mayores de insulina en estos animales (Mashek y col., 2001). Se ha propuesto un efecto estimulador de la insulina sobre la sensibilidad de GH hepática y consecuente síntesis de IGF-I (Butler y col., 2003; Rhoads y col., 2004). Una acción recíproca puede proponerse entre el páncreas y el hígado ya que también se ha demostrado una acción directa del IGF-I sobre las células β -pancreáticas, específicamente en la activación de la glucoquinasa, paso limitante para el metabolismo de la glucosa pancreática responsable de la secreción de insulina (Yoshida y col., 2007).

El nivel de la leptina plasmática es el resultado de la reserva de adipocitos, pero también se modula de una manera más rápida a través del nivel de alimentación (Delavaud y col., 2000). En el presente estudio, la leptina tendió a ser mayor en las ovejas AC, explicado por ser el grupo que presenta mayor cantidad de grasa corporal y ser aquel que está recibiendo mayor nivel de alimentación. En este mismo sentido, en un trabajo previo con condiciones corporales comparables al grupo A del presente estudio (Sosa y col., 2009), observamos importantes diferencias entre el grupo control y el subnutrido. La leptina disminuyó drásticamente en las ovejas más engrasadas tras la subnutrición, pero esta disminución no fue tan acusada en las ovejas delgadas. Se ha demostrado que la leptina ejerce efectos inhibitorios tanto en el control de la expresión como de la secreción de insulina directamente sobre las células pancreáticas (humanos: Seufert y col., 1999; roedores: Morioka y col., 2007). La caída marcada de leptina observada en las ovejas AS tras la subnutrición podría ser un estímulo para el mantenimiento de insulina en plasma, aun con dietas de 0,5 M y niveles de glucosa más bajos. Por otro lado, la disminución moderada en las concentraciones de leptina tras la subnutrición en las ovejas delgadas y los niveles ya deprimidos de IGF-I podría explicar la drástica disminución de insulina. Por lo anteriormente expuesto, se podría especular que estas tres hormonas clave – insulina, leptina e IGF-I– no sólo regulan el flujo metabólico, sino que su regulación es interdependiente facilitando así la comunicación entre estos tres tejidos. A su vez, la leptina informa sobre el nivel de almacenamiento de energía periférica a regiones cerebrales y su acción inhibe el apetito y disminuye la tasa metabólica, por lo que la disminución de esta hormona en animales sometidos a una subnutrición facilitaría el restablecimiento de la homeostasis (Chilliard y col., 2005).

De forma similar a trabajos anteriores realizados por Sosa y col., (2006; 2009) se evidencia el aumento en el momento del celo de las concentraciones de los metabolitos. El resultado de esta movilización de energía alrededor del estro puede estar asociado al estrés y/o liberación de corticosterona/cortisol que se observa en varias especies incluidas los ovinos (Lyimo y col., 2000; Sosa y col., 2013). Por otro lado, el aumento de insulina e IGF-I alrededor del estro en ovinos ha sido comunicado previamente (Viñoles y col., 2005; Sosa y col., 2006; 2009). Estos aumentos estarían asociados al estradiol-17b pre-ovulatorio que puede haber incrementado la secreción pancreática de insulina como ha sido sugerido para ratas (Nadal y col., 1998; Morimoto y col., 2001) y síntesis de IGF-I y/o sus proteínas de unión como se ha determinado en ovejas y vacas (Clapper y col., 1998; Colak y col., 2011). Asimismo, el aumento al estro del IGF-I puede explicarse por el aumento de insulina, ya que en vacas se ha descrito que la insulina aumenta las concentraciones hepáticas del mRNA de IGF-I (Butler y col., 2003; Rhoads y col., 2004). Este estudio muestra la relevancia de que en los estudios metabólicos los animales hayan sido sincronizados para presentar el celo al mismo tiempo, y abre una nueva perspectiva respecto del papel de las hormonas reproductivas sobre la regulación de las hormonas metabólicas.

CONCLUSIÓN

En este estudio se encontró que los perfiles de glucosa, BHB, insulina e IGF-I varían de forma diferente frente a una restricción alimenticia en función del grado de reservas corporales de las ovejas.

ANEXO 1

C. Sosa, et al. *ITEA* (2011), Vol. 107 (4), 1-15

1

Restricción alimenticia en ovinos: respuesta endocrino-metabólica dependiente de las reservas corporales

A. Fernández-Foren*, J.A. Abecia**, M.I. Vázquez**, F. Forcada**, I. Sartore*, M. Carriquiry***, A. Meikle* y C. Sosa**¹

¹ Autor para correspondencia: Cecilia Sosa. E-mail: cecis@unizar.es

* Laboratorio de Técnicas Nucleares, Facultad de Veterinaria, UdelaR, C/ Lasplacas 1550, Montevideo 11600, Uruguay

** Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, C/ Miguel Servet 177, Zaragoza 50013, España

*** Producción Animal, Facultad de Agronomía, UdelaR, Av. Garzón 780, Montevideo 12900, Uruguay

Resumen

Las respuestas metabólicas a los cambios en el estado corporal podrían depender de la historia metabólica reciente (nivel de alimentación, efecto dinámico) o más antigua (reservas corporales, efecto estático), concepto denominado "memoria metabólica". El objetivo de este trabajo fue estudiar la respuesta endocrino-metabólica a una restricción alimenticia en ovejas con diferente condición corporal (CC) al inicio del experimento. Durante la estación reproductiva, 36 ovejas Rasa Aragonesa fueron separadas en 2 grupos con diferente CC: CC > 2,75 (moderadamente alta, A, $2,9 \pm 0,04$) y CC < 2,25 (moderadamente baja, B, $2,1 \pm 0,04$). Durante 20 días, ambos grupos recibieron una dieta para cubrir los requerimientos de mantenimiento de energía y proteína, tras lo cual se asignaron al azar a dos tratamientos nutricionales: 1,5 (control, C) o 0,5 (subnutrición, S) veces los requerimientos de mantenimiento diario, estableciéndose cuatro grupos: altas control (AC, n = 9), altas subnutridas (AS, n = 10), bajas control (BC, n = 9) y bajas subnutridas (BS, n = 8). Se determinó el peso vivo (PV) y los niveles plasmáticos de glucosa, ácidos grasos no esterificados (AGNE), β -hidroxibutirato (BHB), insulina, leptina y factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I). Los grupos BS y AS perdieron peso, el grupo BC lo ganó y las ovejas AC lo mantuvieron. La concentración plasmática de glucosa fue mayor y los AGNE menor en las ovejas controles. Las ovejas de alta CC presentaron mayores concentraciones de insulina y de IGF-I, y la leptina tendió a ser mayor en estos animales. A su vez, la insulina fue mayor en los animales controles, mientras que las otras hormonas no fueron afectadas por el tratamiento. Los perfiles de glucosa, BHB, insulina e IGF-I estuvieron afectados por la CC inicial y el tratamiento nutricional, como así lo demuestra la interacción significativa entre estos factores y días. Se evidenció un aumento en el momento del celo de las concentraciones de los metabolitos (glucosa y BHB) y de las hormonas metabólicas (insulina e IGF-I). En conclusión, en este estudio se encontró que los perfiles de glucosa, BHB, insulina e IGF-I varían de forma diferente frente a una restricción alimenticia en función del grado de reservas corporales de las ovejas en el momento de iniciarse la restricción alimenticia.

Palabras clave: condición corporal, subnutrición, metabolitos, hormonas, ovejas.

Abstract

Food restriction in sheep: endocrine-metabolic response according to the level of body reserves

The metabolic responses to changes in metabolic status could depend on recent (feeding level) or more ancient (body reserves) metabolic history, a concept termed "metabolic memory". The aim of this work was to study the metabolic response to food restriction in ewes with different body condition score at the

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Abecia JA, Forcada F, Zarazaga L, Lozano JM (1993). Effect of plane of protein after weaning on resumption of reproductive activity in Rasa Aragonesa ewes lambing in late spring. *Theriogenology*. 39(2): 463-473.
- 2) Abecia JA, Rhind SM, Bramley TA, McMillen SR (1995). Steroid production and LH receptor concentrations of ovarian follicles and corpora lutea and associated rates of ova wastage in ewes given high and low levels of food intake before and after mating. *Animal Science*. 61: 57-62.
- 3) Adrien ML, Mattiauda DA, Artegoitia V, Carriquiry M, Motta G, Bentancur O, Meikle A (2012). Nutritional regulation of body condition score at the initiation of the transition period in primiparous and multiparous dairy cows under grazing conditions: milk production, resumption of post-partum ovarian cyclicity and metabolic parameters. *Animal*. 6(2): 292-299.
- 4) Agricultural and Food Research Council (AFRC), (1993). Energy and protein requirements of ruminants. An advisor manual prepared by the AFRC technical committee on responses to nutrients. Wallingford, UK, CAB International, 159p.
- 5) Bassett JM, Weston RH, Hogan JP (1971). Dietary regulation of plasma insulin and growth hormone concentrations in sheep. *Australian Journal of Biological Sciences*. 24: 321-30.
- 6) Bell AW, Bauman DE (1997). Adaptations of glucose metabolism during pregnancy and lactation. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 2(3): 265-278.
- 7) Bell AW (1995). Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *Journal of Animal Science*. 73(9): 2804-2819.
- 8) Blache D, Zhang S, Martin GB (2006). Dynamic and integrative aspects of the regulation of reproduction by metabolic status in male sheep. *Reproduction Nutrition Development*. 46(4): 379-390.
- 9) Blanc F, Bocquier F, Agabriel J, D'Hour P, Chilliard Y (2006). Adaptive abilities of the females and sustainability of ruminant livestock systems. A review. *Animal Research*. 55: 489-510.
- 10) Bouchat JC, Doize F, Paquay R (1981). Influence of diet and prolonged fasting on blood lipids, ketone bodies, glucose and insulin in adult sheep. *Reproduction Nutrition Development*. 21(1): 69-81.
- 11) Breier BH (1999). Regulation of protein and energy metabolism by the somatotrophic axis. *Domestic Animal Endocrinology*. 17(2-3): 209-218.
- 12) Burke CR, Roche JR (2007). Effects of pasture feeding during the periparturient period on postpartum anovulation in grazed dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 90(9): 4304-4312.

- 13) Butler ST, Marr AL, Pelton SH, Radcliff RP, Lucy MC, Butler WR (2003). Insulin restores GH responsiveness during lactation-induced negative energy balance in dairy cattle: effects on expression of IGF-I and GH receptor 1A. *Journal of Endocrinology*. 176(2): 205-217.
- 14) Caldeira RM, Belo AT, Santos CC, Vazques MI, Portugal AV (2007). The effect of long-term feed restriction and over-nutrition on body condition score, blood metabolites and hormonal profiles in ewes. *Small Ruminant Research*. 68: 242–255.
- 15) Caldeira RM, Portugal AV (2007). Relationships of body composition and fat partition with body condition score in Serra da Estrela ewes. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*. 20(7):1108-1114.
- 16) Carambula M (2008). *Pasturas Naturales Mejoradas*. Montevideo Hemisferio Sur, 530p.
- 17) Chilliard Y, Delavaud C, Bonnet M (2005). Leptin expression in ruminants: nutritional and physiological regulations in relation with energy metabolism. *Domestic Animal Endocrinology*. 29(1): 3-22.
- 18) Chilliard Y, Bonnet M, Delavaud C, Faulconnier Y, Leroux C, Djiane J, Bocquier F (2001). Leptin in ruminants. Gene expression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration. *Domestic Animal Endocrinology*. 21(4): 271-295.
- 19) Chilliard Y, Ferlay A, Faulconnier Y, Bonnet M, Rouel J, Bocquier F (2000). Adipose tissue metabolism and its role in adaptations to undernutrition in ruminants. *Proceedings of the Nutrition Society*. 59(1): 127-134.
- 20) Chilliard Y, Bocquier F, Doreau M (1998). Digestive and metabolic adaptations of ruminants to undernutrition, and consequences on reproduction. *Reproduction Nutrition Development*. 38(2): 131-152.
- 21) Chiquete E, Tolosa P (2013). Conceptos tradicionales y emergentes sobre el balance energético. *Revista de Endocrinología y Nutrición*. 21(2): 59-68.
- 22) Clapper JA, Snyder JL, Roberts AJ, Hamernik DL, Moss GE (1998). Estradiol increases relative amounts of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-3 in serum and expression of IGFBP-2 in anterior pituitaries of ewes. *Biology of Reproduction*. 59(1): 124-130.
- 23) Colak M, Shimizu T, Matsunaga N, Murayama C, Nagashima S, Kataoka M, Kawashima C, Matsui M, Dorland HV, Bruckmaier R, Miyamoto A (2011). Oestradiol Enhances Plasma Growth Hormone and Insulin-like Growth Factor-I Concentrations and Increased the Expression of their Receptors mRNAs in the Liver of Ovariectomized Cows. *Reproduction in Domestic Animals*. 46(5):854–861.

- 24) Collier RJ, McNamara JP, Wallace CR, Dehoff MH (1984). A review of endocrine regulation of metabolism during lactation. *Journal of Animal Science*. 59:498-510.
- 25) de Brun V (2014). Efecto de la subnutrición materna sobre la gestación temprana en ovinos: énfasis endócrino-metabólico. Tesis de Maestría, Facultad de Veterinaria, UdelaR, 58 p.
- 26) Delavaud C, Bocquier F, Chilliard Y, Keisler DH, Gertler A, Kann G (2000). Plasma leptin determination in ruminants: effect of nutritional status and body fatness on plasma leptin concentration assessed by a specific RIA in sheep. *Journal of Endocrinology*. 165(2): 519-526.
- 27) Drackley JK, Donkin SS, Reynolds CK (2006). Major advances in fundamental dairy cattle nutrition. *Journal of Dairy Science*. 89: 1324-1336.
- 28) Etherton TD (2004). Somatotropic function: the somatomedin hypothesis revisited. *Journal of Animal Science*. 82 E-Suppl: E239-244.
- 29) Flint DJ, Binart N, Kopchick J, Kelly P (2003). Effects of growth hormone and prolactin on adipose tissue development and function. *Pituitary*. 6(2): 97-102.
- 30) Friggens NC, Brun-Lafleur L, Faverdin P, Sauvant D, Martin O (2013). Advances in predicting nutrient partitioning in the dairy cow: recognizing the central role of genotype and its expression through time. *Animal*. 7(suppl 1):89-101.
- 31) Grummer RR (1993). Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 76: 3882-3896.
- 32) Ingvarstsen KL, Andersen JB (2000). Integration of metabolism and intake regulation: a review focusing on periparturient animals. *Journal of Dairy Science*. 83(7): 1573-1597.
- 33) Kobayashi Y, Boyd CK, Bracken CJ, Lamberson WR, Keisler DH, Lucy MC (1999). Reduced growth hormone receptor (GHR) messenger ribonucleic acid in liver of periparturient cattle is caused by a specific down-regulation of GHR 1A that is associated with decreased insulin-like growth factor I. *Endocrinology*. 140(9): 3947-3954.
- 34) Lozano JM, Abecia JA, Forcada F, Zarazaga L, Alfaro B (1998). Effect of undernutrition on the distribution of progesterone in the uterus of ewes during the luteal phase of the estrous cycle. *Theriogenology*. 49: 539-546.
- 35) Lyimo ZC, Nielen M, Ouweltjes W, Kruip TA, van Eerdenburg FJ (2000). Relationship among estradiol, cortisol and intensity of estrous behavior in dairy cattle. *Theriogenology*. 53(9): 1783-1795.
- 36) Martin GB, Milton JT, Davidson RH, Banchero Hunzicker GE, Lindsay DR, Blache D (2004). Natural methods for increasing reproductive efficiency in small ruminants. *Animal Reproduction Science*. 82-83: 231-245.

- 37) Mashek DG, Ingvarsten KL, Andersen JB, Vestergaard M, Larsen T (2001). Effects of a four- day hyperinsulinemic-euglycemic clamp in early and mid-lactation dairy cows on plasma concentrations of metabolites, hormones, and binding proteins. *Domestic Animal Endocrinology*. 21(3): 169-185.
- 38) Meikle A, Cavestany D, Carriquiry M, Adrien L, Rupprechter G, Rovere G, Peñagaricano F, Mendoza A, Pereira I, Mattiauda D, Chilbroste P (2010). Endocrinología metabólica en la vaca lechera durante el período de transición y su relación con el reinicio de la ciclicidad ovárica. *Agrociencia*. 14(3): 89-95.
- 39) Meikle A, Kulcsar M, Chilliard Y, Febel H, Delavaud C, Cavestany D, Chilbroste P (2004). Effects of parity and body condition at parturition on endocrine and reproductive parameters of the cow. *Reproduction*. 127: 727-737.
- 40) Montossi F, San Julián R, de Mattos D, Berretta E J, Zamit W, Levratto J C, Ríos M (1998). Impacto del manejo de la condición corporal al parto sobre la productividad de ovejas Corriedale y Merino. Seminario sobre actualización de tecnologías para el Basalto. INIA Tacuarembó, Serie Técnica N° 102, pp. 185 - 194.
- 41) Morimoto S, Cerbon MA, Alvarez-Alvarez A, Romero-Navarro G, Diaz-Sanchez V (2001). Insulin gene expression pattern in rat pancreas during the estrous cycle. *Life Sciences*. 68(26): 2979-2985.
- 42) Morioka T, Asilmaz E, Hu J, Dishinger JF, Kurpad AJ, Elias CF, Li H, Elmquist JK, Kennedy RT, Kulkarni RN (2007). Disruption of leptin receptor expression in the pancreas directly affects beta cell growth and function in mice. *Journal of Clinical Investigation*. 117(10): 2860-2868.
- 43) Nadal A, Rovira JM, Laribi O, Leon-quinto T, Andreu E, Ripoll C, Soria B (1998). Rapid insulinotropic effect of 17beta-estradiol via a plasma membrane receptor. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*. 12(13): 1341-1348.
- 44) Pedron O, Cheli F, Senatore E, Baroli D, Rizzi R (1993). Effect of body condition score at calving on performance, some blood parameters, and milk fatty acid composition in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 76(9): 2528-2535.
- 45) Petterson JA, Dunshea FR, Ehrhardt RA, Bell AW (1993). Pregnancy and undernutrition alter glucose metabolic responses to insulin in sheep. *Journal of Nutrition*. 123(7): 1286-1295.
- 46) Pinotti L, Rosi F (2006). Leptin in bovine colostrums and milk. *Hormone and Metabolic Research*. 38(2): 89-93.
- 47) Pisabarro R, Irruzábal E, Reculde A, Barrios E, Arocenu A, Aguirre B, García boriente JM, Bonifuzio JL (1999). Leptina: una hormona secretada por el tejido adiposo. Primer estudio en muestra poblacional uruguaya. *Revista Médica del Uruguay*. 15: 43-48.

- 48) Renaville R, Hammadi M, Portetelle D (2002). Role of the somatotrophic axis in the mammalian metabolism. *Domestic Animal Endocrinology*. 23(1-2):351-360.
- 49) Rhoads RP, Kim JW, Leury BJ, Baumgard LH, Segoale N, Frank SJ, Bauman DE, Boisclair YR (2004). Insulin increases the abundance of the growth hormone receptor in liver and adipose tissue of periparturient dairy cows. *Journal of Nutrition*. 134(5): 1020-1027.
- 50) Russel AJF, Doney JM, Gunn RG (1969). Subjective assessment of body fat in live sheep. *Journal of Agricultural Science* 72: 451-454.
- 51) Scaramuzzi R J, Campbell B K, Downing J A, Kendall N R, Khalid M, Munoz-Gutierrez M, Somchit A (2006). A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reproduction Nutrition Development*. 46: 339-354.
- 52) Seufert J, Kieffer TJ, Leech CA, Holz GG, Moritz W, Ricordi C, Habener JF (1999). Leptin suppression of insulin secretion and gene expression in human pancreatic islets: implications for the development of adipogenic diabetes mellitus. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 84(2): 670-676.
- 53) Soca P, Carriquiry M, Claramunt M, Rupprechter G, Meikle A (2013). Metabolic and endocrine profiles of primiparous beef cows grazing native grassland. 2. Effects of body condition score at calving, type of suckling restriction and flushing on plasmatic and productive parameters. *Animal Production Science*. 54(7):862-868.
- 54) Sosa C , Forcada F, Meikle A, Abecia JA (2013). Increase in ovine plasma cortisol at oestrus and its relation with the metabolic status during the sexual cycle in sheep. *Biological Rhythm Research*. 44(3): 445-449.
- 55) Sosa C, Abecia JA, Carriquiry M, Forcada F, Martin GB, Palacin I, Meikle A (2009). Early pregnancy alters the metabolic responses to restricted nutrition in sheep. *Domestic Animal Endocrinology*. 36(1): 13-23.
- 56) Sosa C, Abecia JA, Forcada F, Vinales C, Tasende C, Valares JA, Palacin I, Martin GB, Meikle A (2006). Effect of undernutrition on uterine progesterone and oestrogen receptors and on endocrine profiles during the ovine oestrous cycle. *Reproduction Fertility and Development*. 18(4): 447-458.
- 57) Sosa C, Lozano JM, Vinales C, Acuna S, Abecia JA, Forcada F, Forsberg M, Meikle A (2004). Effect of plane of nutrition on endometrial sex steroid receptor expression in ewes. *Animal Reproduction Science*. 84(3-4): 337-348.
- 58) Thissen JP, Ketelslegers JM, Underwood LE (1994). Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocrine Reviews*. 15(1): 80-101.
- 59) Viñoles C, Banchemo G, Quintans G, Pérez-Clariget R, Soca P, Ungerfeld R, Bielli A, Fernández Abella D, Formoso D, Pereira Machín M, Meikle A (2009). Estado

actual de la investigación vinculada a la Producción Animal Limpia, Verde y Ética en Uruguay. *Agrociencia*. 13(3):59 – 79.

- 60) Viñoles C, Forsberg M, Martin GB, Cajarville C, Repetto J, Meikle A (2005). Short-term nutritional supplementation of ewes in low body condition affects follicle development due to an increase in glucose and metabolic hormones. *Reproduction*. 129(3): 299-309.
- 61) Whitaker D, Goodger W, Garcia M, Perera B, Wittwer F (1999). Use of metabolic profiles in dairy cattle in tropical and subtropical countries on smallholder dairy farms. *Preventive Veterinary Medicine*. 38(2-3): 119-131.
- 62) Williams CB, Oltenacu PA, Sniffen CJ (1989). Refinements in determining the energy value of body tissue reserves and tissue gains from growth. *Journal of Dairy Science*. 72(1): 264-269.
- 63) Yasari S, Wang D, Prud'homme D, Jankowski M, Gutkowska J, Lavoie JM (2009). Exercise training decreases plasma leptin levels and the expression of hepatic leptin receptor-a, -b, and, -e in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 324(1-2): 13-20.
- 64) Yoshida K, Murao K, Imachi H, Cao WM, Yu X, Li J, Ahmed RA, Kitanaka N, Wong NC, Unterman TG, Magnuson MA, Ishida T (2007). Pancreatic glucokinase is activated by insulin-like growth factor-I. *Endocrinology*. 148(6): 2904-2913.